

نقش نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی بر آپوپتوز و بیان ژن Bax در هیپوکامپ رت متعاقب ایسکمی ریپرفیوژن

شقایق باقری طاری (MSc)^۱، زینب خزائی کوهپر (PhD)^{۲*}، مجتبی فلاحی (PhD)^۲

۱- گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی
۲- گروه نانو تکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی

دریافت: ۹۶/۴/۱۶، اصلاح: ۹۶/۷/۳۰، پذیرش: ۹۶/۹/۲۱

خلاصه

سابقه و هدف: سکنه مغزی دومین علت منجر به مرگ در جهان است. بعد از سکنه مغزی، بسیاری از نوروها در مرز ایسکمی متحمل آپوپتوز می شوند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی در کاهش آپوپتوز بعد از ایسکمی ریپرفیوژن در مدل رت می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۵۰ سر رت نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۲۰ گرم) بطور تصادفی به ۵ گروه ده تایی شامل کنترل، شم (ایسکمی ریپرفیوژن)، ایسکمی ریپرفیوژن+تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن (۱۰ mg/kg)، ایسکمی ریپرفیوژن+میدان مغناطیسی (۱ تسلا، ۲۰ دقیقه روزانه به مدت ۴ روز) و ایسکمی ریپرفیوژن+استفاده از نانو ذره اکسید آهن و میدان مغناطیسی به طور همزمان تقسیم شد. تزریق ها به روش درون صفاقی انجام شد. بعد از چهار روز، هیپوکامپ ها از مغز موش ها جهت مطالعه القاء آپوپتوزیس (به روش TUNEL) و تغییرات بیان ژن Bax (به روش Q-PCR) جدا شده و مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: بعد از القاء ایسکمی ریپرفیوژن، تعداد سلول های تانل مثبت تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن (۷±۲) و یا میدان مغناطیسی (۱۲±۲) در طول ۴ روز کاهش معنی داری نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن (۲۷±۵) نشان داد ($P<0/01$). اما تیمار همزمان با نانوذرات و میدان مغناطیسی (۲۳±۲/۶) تفاوت معنی داری در مقایسه با گروه ایسکمی ریپرفیوژن (۲۷±۵) در طول ۴ روز نشان نداد. بعلاوه بیان ژن Bax در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن (۲/۴۶±۰/۲۲) یا در گروه در معرض میدان مغناطیسی (۳/۳۳±۰/۲۸) به طور معنی داری ($P<0/01$) در مقایسه با مدل ایسکمی ریپرفیوژن (۵/۲۱±۰/۷۳) کاهش داشت.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، به نظر می رسد که نانوذرات اکسید آهن، همینطور میدان مغناطیسی دو روش مؤثر در کاهش آپوپتوز بعد از ایسکمی ریپرفیوژن باشند.

واژه های کلیدی: Bax، اکسید آهن، ایسکمی ریپرفیوژن، میدان مغناطیسی، نانوذرات.

مقدمه

اکسید آهن با اهداف مختلفی چون ردیابی سلولی یا ردیابی داروهای ضد سرطانی به همراه MRI (Magnetic Resonance Imaging) استفاده می شود (۶). هدایت داروها، آنزیم ها و آنتی بادی ها با نانوذرات اکسید آهن تحت تأثیر یک میدان مغناطیسی به اندام، بافت یا موضع سرطانی می تواند یکی دیگر از کاربردهای درمانی آن باشد (۷). مزیت بالقوه نانوذرات اکسید آهن در درمان ضایعات عصبی، توان بالای آن ها در تبادل مواد بین بافت و خون پس از ایسکمی است (۸). همچنین مشخص شده که میدان های مغناطیسی منجر به ایجاد تغییراتی در نفوذپذیری غشاء سلولی و بر هم کنش با یون ها و مولکول های آلی مثل پروتئین ها و نوکلئیک اسیدها و در نتیجه افزایش رشد سلولی می شود (۹، ۱۰). با توجه به اینکه ایسکمی باعث آسیب های جبران ناپذیری به بافت مغز می شود، در این مطالعه، تأثیر نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی بر مغز موش بعد از ایسکمی ریپرفیوژن (Ischemic Reperfusion=IR) بر کاهش آپوپتوز و بیان ژن Bax مورد ارزیابی قرار گرفته است.

سکنه مغزی دومین علت مرگ (۱) و یکی از شایع ترین دلایل ناتوانی (۲) بالغین در دنیا محسوب می شود. برای درمان بخش های آسیب دیده مغز ناشی از سکنه مغزی روش های درمانی مختلفی برای نورو زایی، رگ زایی، افزایش طول آکسونی و سیناپتوژن می باشد؛ از جمله پیوند سلول های بنیادی عصبی، مزنشیمال، جنینی و یا سلول های بنیادی چند توانه وجود دارد (۱). با توجه به نقش کلیدی هیپوکامپ در یادگیری و حافظه (۳)، کاهش آسیب وارده به این بخش و ترمیم آن در آسیب های ناشی از سکنه مغزی دارای اهمیت ویژه ای می باشد. استفاده از سلول های بنیادی موجود در هیپوکامپ به منظور ترمیم ضایعات عصبی امروزه به عنوان سیاستی مهم و کارآمد در درمان بیمارهای عصبی محسوب می گردد (۴). بطوریکه القاء، تکثیر و تمایز سلول های بنیادی عصبی موجود در لایه زیر بطنی منجر به افزایش بهبود و ترمیم ضایعات عصبی می گردد (۵). امروزه از نانوذرات

این مقاله حاصل پایان نامه شقایق باقری طاری دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر زینب خزائی کوهپر

E-mail: khazaei@toniau.ac.ir

آدرس: تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی. تلفن: ۰۱۱-۵۴۲۷۱۱۰۵

گروه ۳ (گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن): حیوانات ۲۰ دقیقه پس از القاء آسیب مغزی با دوز ۱۰ mg/kg از نانو ذره اکسید آهن به صورت داخل صفاقی تیمار شدند.

گروه ۴ (گروه در معرض میدان مغناطیسی): سر حیوانات در حالت بیهوشی ۲۰ دقیقه پس از القاء آسیب مغزی، به مدت ۴ روز در میدان مغناطیسی ۱ تسلا (هر ۲۴ ساعت یکبار و هر بار بمدت ۲۰ دقیقه) قرار داده شد (شکل ۱).

گروه ۵ (گروه در معرض میدان مغناطیسی و نانوذرات اکسید آهن): تیمار حیوانات، ۲۰ دقیقه پس از القاء آسیب مغزی با نانوذره اکسید آهن (۱۰ mg/kg) به صورت داخل صفاقی صورت گرفت و سپس سر حیوانات در حالت بیهوشی، به مدت ۴ روز در میدان مغناطیسی ۱ تسلا (هر ۲۴ ساعت یکبار و هر بار ۲۰ دقیقه) قرار داده شد. در روز چهارم بعد از تیمارهای مختلف، حیوانات در تمامی گروه‌ها بیهوش شده و پس از جداسازی سر، مغز موش‌ها در محلول نمکی سرد قرار داده شد.



شکل ۱. تصویر مولد میدان مغناطیسی و نحوه قراردادی مجموعه حیوانات در میدان مغناطیسی ۱ تسلا به مدت ۲۰ دقیقه در روز.

برش فروزن از مغز و رنگ آمیزی TUNEL: به منظور بررسی میزان آپوپتوز در نوروها بعد از القاء ایسکمی ریپرفیوژن و تغییر در میزان مرگ بعد از تیمارهای مختلف از رنگ آمیزی اختصاصی آپوپتوز (رنگ آمیزی TUNEL) استفاده شد. به این منظور ابتدا از بافت مغز نگه داری شده در فریزر -80°C ، بلوک پارافینه تهیه و در نیتروژن مایع قرار داده شد. سپس هر بلوک در دستگاه میکروتوم فروزن قرار داده شده و برش‌هایی در ابعاد $3-5\ \mu\text{m}$ از این بافت تهیه شد و بر روی لام حاوی محلول OCT قرار داده شد.

برای مشخص نمودن سلولهای آپوپتوتیک، رنگ آمیزی تانل با استفاده از دستورالعمل کیت In situ Direct DNA Fragmentation Assay Kit (TUNEL) (Abcam، انگلستان) صورت گرفت. ابتدا برش‌های تهیه شده از بافت به ترتیب با محلول پروتئیناز K به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه در دمای ۳۷-۲۱ درجه سانتیگراد انکوبه و سپس با PBS شستشو داده شد. مواجهه بافت با هیدروژن پراکسید ۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انجام شد و سپس با PBS شستشو داده شد. به منظور افزایش میزان نفوذپذیری بافت مورد نظر، قطعات بافتی بر روی یخ به مدت دو دقیقه قرار داده شد و بعد محلول TUNEL Reaction Mixture به هر مقطع بافتی افزوده شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید و سپس شستشو با PBS انجام شد. بدنبال آن، محلول Converter-POD، 3 افزوده شده و ۳۰

مواد و روش‌ها

حیوانات: این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران به شماره ۱۳۹۳.۴۵. REC.iauuz بر روی ۵۰ سرموش صحرایی نر، نژاد ویستار به وزن ۲۵۰-۲۲۰ گرم از دانشگاه تهران (گروه فارماکولوژی) انجام شد. موش‌ها در اتاقی با دوره روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته و دمای 25 ± 2 درجه سانتیگراد و تأمین آب و غذا نگهداری شدند.

موش‌ها در پنج گروه ۱۰ تایی (۱ کنترل: حیوانات سالم، ۲ شم: حیوانات مدل ایسکمی ریپرفیوژن (IR) که تنها با محلول نمکی نرمال (حلال) تیمار شدند، ۳) گروه آزمایشی یک: حیوانات مدل ایسکمی ریپرفیوژن مغزی که با ۱۰ mg/kg از نانو ذره اکسید آهن تیمار شدند، ۴) گروه آزمایشی دو: حیوانات مدل ایسکمی ریپرفیوژن مغزی که روزانه (به مدت ۴ روز) تحت تأثیر میدان مغناطیسی به قدرت ۱ تسلا قرار گرفتند و ۵) گروه آزمایشی سه: شامل حیوانات مدل ایسکمی ریپرفیوژن مغزی که با ۱۰ mg/kg از نانو ذره اکسید آهن تیمار شده و روزانه تحت تأثیر میدان مغناطیسی به قدرت ۱ تسلا قرار گرفتند، تقسیم شدند. سپس برای القاء بیهوشی در حیوانات از ترکیب داروهای زایلازین (شرکت Alfasan، هلند) و کتامین (شرکت Rotexmedica، آلمان) استفاده گردید. که با نسبت ۱:۵ (۵ میلی لیتر از کتامین + ۱ میلی لیتر زایلازین) تهیه و به مقدار ۱۰ mg/kg بر اساس وزن هر حیوان به صورت داخل صفاقی تزریق گردید.

القاء ایسکمی ریپرفیوژن مغزی در موش: بعد از بیهوشی، یک برش عمودی در ناحیه گردن داده شد و به دنبال آن عروق کاروتید مشترک در هر دو سمت قابل مشاهده گردید. پس از جداسازی عصب واگ، عروق کاروتید توسط کلامپ میکروسرجری به مدت ۲۰ دقیقه مسدود شدند و خونرسانی به مغز متوقف گردید. در زمان ایسکمی درجه حرارت بدن حیوان مرتباً بررسی شد و پس از ۲۰ دقیقه کلامپ‌ها برداشته شده و گردش خون مجدداً برقرار گردید. پس از القاء ایسکمی، ماهیچه‌های جدا شده در محل آناتومیک خود قرار داده شد و بخش برش داده شده، بخیه گردید.

سوسپانسیون نانوذرات اکسید آهن: نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) (Iron Oxide (III) Magnetic Nanoparticles powder) بصورت پودر در ابعاد ۱۰ نانومتر از شرکت سیگما-آلدريج (آلمان) خریداری شد. نانوذرات اکسید آهن با غلظت نهایی ۱۰ mg/ml به محلول نمکی در درجه حرارت ۳۵-۴۰ درجه سانتی گراد اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه به منظور تهیه سوسپانسیون ورتکس گردید.

تیمار حیوانات: به منظور تیمار حیوانات در گروه‌های مختلف، پس از گروه بندی و جراحی حیوانات، گروه‌ها با الگوی زیر تیمار گردیدند.

گروه ۱ (گروه کنترل): حیوانات سالمی بودند که ۲۰ دقیقه پس از ایجاد شکاف در ناحیه گردن با محلول نمکی نرمال (حلال نانو ذره) به صورت داخل صفاقی تیمار شدند، سپس بدون القاء ایسکمی ریپرفیوژن، پوست حیوانات بخیه شد.

گروه ۲ (گروه شم): در این گروه ۲۰ دقیقه پس از القاء آسیب مغزی حیوانات با محلول نمکی نرمال تیمار شدند.

Scientific، آمریکا) قرار داده شد. در ادامه تفاوت سطح بیان ژن *Bax*، در گروه های مورد مطالعه به روش Q-PCR نسبت به ژن رفرنس β -actin به کمک کیت SYBR Green Master Mix (یکتا تجهیز، ایران) مقایسه شد. واکنش در دستگاه iCycler iQ™ Real-TimePCR Detection System (Biorad، آمریکا) طبق برنامه بصورت یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۴۰ سیکل واکنش تکثیر شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه و اتصال پرایمرها/طویل سازی در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۱ ثانیه و شرایط دمایی مرحله تشکیل منحنی ذوب شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد.

توالی پرایمر های مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است. از ژن β اکتین به عنوان ژن مرجع استفاده شد. همه آزمایشات حداقل سه بار تکرار شد و نتایج به کمک معادله $2^{-\Delta\Delta CT}$ آنالیز گردید. داده ها با استفاده از آزمون های آماری t-test، one way ANOVA و تست تکمیلی Tukey تجزیه و تحلیل شدند $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج رنگ آمیزی لام های مربوط به گروه های مورد مطالعه با استفاده از کیت TUNEL؛ تصاویر گرفته شده از ناحیه CA1 هیپوکامپ رت در گروه های مورد مطالعه با رنگ آمیزی تانل در شکل ۲ نشان داده شده است. این روش برای ارزیابی کمی آپوپتوز بطور گسترده ای بکار می رود.

دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شده و سپس با استفاده از PBS شستشو داده شد. پس از شستشو، به بافت ها ماده کروموزن DAB افزوده شد به مدت ۱۰-۵ دقیقه در دمای ۲۵-۱۵ درجه انکوبه گردید و سپس با استفاده از PBS شستشو داده شد. در نهایت از هر گروه سه لام به صورت تصادفی انتخاب و در هر لام پنج فیلد با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 400$ مورد بررسی قرار گرفت.

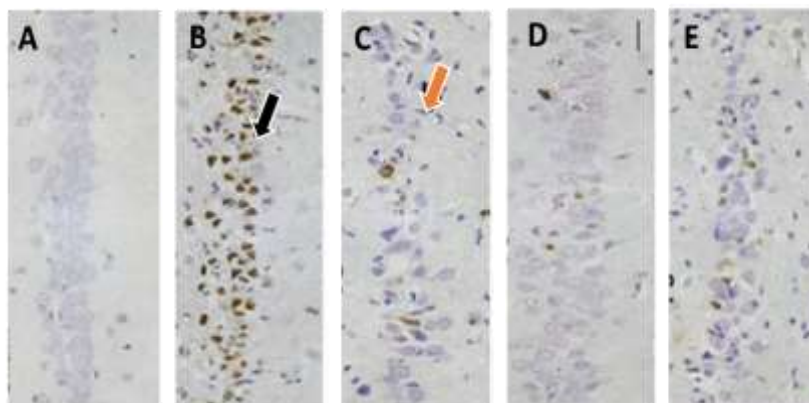
بررسی نمونه های بافتی از نظر میزان آپوپتوز: در تمامی بافت های تهیه شده به منظور بررسی میزان آپوپتوز در ناحیه CA1 هیپوکامپ از رنگ آمیزی TUNEL استفاده شد. در این نوع رنگ آمیزی، سلول های دچار آپوپتوز ($TUNEL^+$) دارای هسته پر رنگ (مشکی تا قهوه ای رنگ) با ساختاری قطعه قطعه بوده و سلول های سالم فاقد این ساختارها هستند. تعداد کل سلول های $TUNEL^+$ (اجسام آپپوتوتیک) در ناحیه CA1 مغز حیوانات نشان دهنده میزان آپوپتوز در این بخش از مغز حیوانات می باشد. شمارش سلول های $TUNEL^+$ به کمک نرم افزار Image Tools انجام شد.

استخراج RNA: به منظور استخراج RNA از ناحیه CA1 هیپوکامپ، از کیت RNX-Plus Solution (سینازن، ایران) استفاده شد. RNA استخراج شده از نمونه های مختلف از نظر کمی به کمک اسپکتروفتومتر نانودراپ ۱۰۰۰ (Thermo، آمریکا) و از نظر کیفی در ژل آگارز ۱٪ بررسی شد.

بررسی بیان ژن *Bax* به روش Q-PCR: برای بررسی متغیر بیان ژن *Bax* از واکنش Q-PCR استفاده شد. در ابتدا سنتز cDNA به کمک RNA استخراج شده و کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific، آمریکا) صورت گرفت. مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، مواد تهیه شده در میکروتیوپ به منظور سنتز cDNA داخل دستگاه ترموسایکلر Applied Biosystems 2720 (Thermo Fisher)

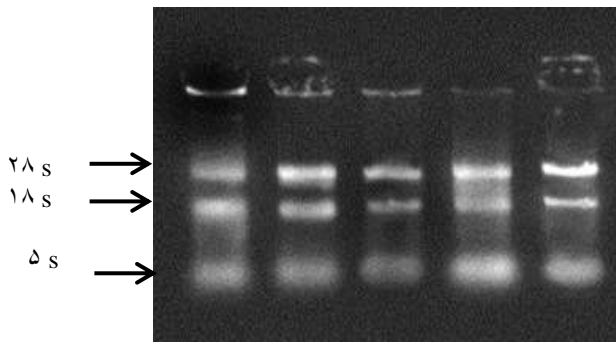
جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام ژن	توالی	طول محصول
<i>Bax</i>	Forward 5- AGACAGGGGCCTTTTGTGCTAC -3	۱۳۲bp
	Reverse 5- AATTCCGCCGAGACACTCG -3	
β -actin	Forward 5-TCCGTGTGGCATCCACGAAACT-3	۱۸۵bp
	Reverse 5-GGAGCAATGATCTTGATCTTC-3	

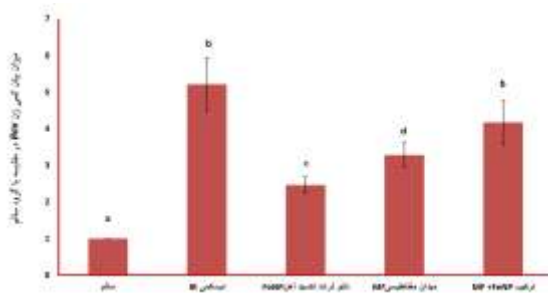


شکل ۲. ناحیه CA1 از هیپوکامپ رت در ۵ گروه مورد مطالعه. رنگ آمیزی تانل، بزرگنمایی $\times 400$ (فلش مشکی: سلول های دچار آپوپتوز (اجسام آپپوتوتیک) و فلش قرمز: سلول های سالم را نشان می دهد. (A) گروه سالم، (B) گروه IR، (C) گروه IR+ Fe2O3 NP، (D) گروه IR+ Magnetic field و (E) گروه IR+Fe2O3 field + Magnetic

اکسید آهن به تنهایی (۲/۴۶±۰/۲۲) بیشتر از نرخ کاهش بیان ژن *Bax* در گروه در معرض میدان مغناطیسی (۳/۲۸±۰/۳۳) بود ($p<0/05$) (نمودار ۲).



شکل ۳. نتیجه الکتروفورز پنج نمونه RNA استخراج شده از گروه‌های مختلف آزمایشی. در ژل آگارز ۱٪ وجود سه باند واضح (*rRNA* 18s, *rRNA* 28s و *rRNA* 5s) در ژل آگارز نشان دهنده صحت فرآیند تخلیص و عدم تخریب نمونه‌های RNA می‌باشد



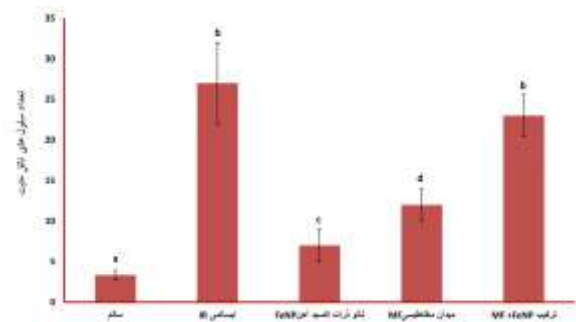
نمودار ۲. مقایسه بیان ژن *Bax* در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. حروف غیر یکسان: تفاوت معنی دار است

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص شد که نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی بطور جداگانه نقش مؤثری در کاهش آپوپتوز بعد از القاء ایسکمی ریپرفیوژن در هیپوکامپ موش دارند. Kim و همکاران در مطالعه خود مشاهده کردند که میزان بقا و اتصالات سلول‌های عصبی تحت تیمار با این نانوذرات در شرایط *Invitro* به طور معنی داری افزایش می‌یابد (۱۱).

در مطالعه حاضر نیز کاهش مرگ سلول‌های هیپوکامپ و به عبارتی افزایش بقای سلول‌های تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن مشاهده شد. پس از ایسکمی با بازگشت جریان خون، سطح بالایی از رادیکال‌های آزاد تولید می‌شوند که باعث آسیب به اندامکها و در نتیجه سلول‌های عصبی می‌شود (۱۲). به نظر می‌رسد نانوذرات اکسید آهن با کاهش رادیکال‌های آزاد باعث کاهش آپوپتوز و افزایش بقای سلول شوند. در مطالعه Estevez و همکاران مشاهده شد که استفاده از نانوذرات اکسیدسربوم به دلیل توانایی قوی در مهار رادیکال‌های آزاد باعث کاهش عوارض ناشی از ایسکمی در مغز موش و کاهش مرگ نورون‌ها بعد از ایسکمی می‌شود (۱۲). بنابراین به نظر می‌رسد نانوذرات اکسید آهن نیز با داشتن توان مهار رادیکال‌های آزاد در بقای سلول‌های عصبی نقش داشته باشند. بطوریکه در مطالعه Apopa و همکاران مشخص شد که نانوذرات اکسید آهن توان بالقوه ای

بررسی میزان آپوپتوز در گروه‌های مختلف آزمایشی: نتایج تست TUNEL نشان داد که ایجاد ایسکمی ریپرفیوژن (IR) منجر به افزایش معنی دار ($p<0/01$) تعداد سلول‌های $TUNEL^+$ (۲۷±۵) نسبت به گروه سالم (۳/۳۳±۰/۵۸) mg/kg شد. در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن با غلظت ۱۰ mg/kg کاهش معنی دار ($p<0/01$) تعداد سلول‌های $TUNEL^+$ (۷±۲) نسبت به گروه IR (۲۷±۵) مشاهده شد. در گروه در معرض میدان مغناطیسی با شدت ۱ تسلا (به مدت ۲۰ دقیقه طی ۴ روز) کاهش معنی دار ($p<0/01$) تعداد سلول‌های $TUNEL^+$ (۱۲±۲) نسبت به گروه IR (۲۷±۵) رخ داد. در گروه با تیمار ترکیبی شامل نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی (۲۳±۲/۶) تفاوت آماری قابل توجهی نسبت به گروه IR (۲۷±۵) در کاهش تعداد سلول‌های $TUNEL^+$ مشاهده نشد. اما افزایش معنی دار تعداد سلول‌های $TUNEL^+$ در مقایسه همین گروه (تیمار ترکیبی) (۲۳±۲/۶) با گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن به تنهایی (۷±۲) ($p<0/01$) و یا میدان مغناطیسی (۱۲±۲) ($p<0/05$) مشاهده شد. همچنین نتایج این آزمایش نشان داد که گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن (۷±۲) نسبت به گروه در معرض میدان مغناطیسی (۱۲±۲)، تعداد سلول‌های $TUNEL^+$ کمتری داشتند ($p<0/05$) (نمودار ۱).



نمودار ۱. اجسام آپوپتوتیک در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه‌های مختلف مورد آزمایش. حروف غیر یکسان: تفاوت معنی دار است

بررسی بیان ژن *Bax* در گروه‌های مورد مطالعه: بعد از اطمینان از صحت RNA استخراج شده (شکل ۳)، بیان ژن *Bax* در گروه‌های مختلف آزمایشی بصورت کمی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از محاسبات آماری نشان داد که ایجاد ایسکمی ریپرفیوژن (IR) باعث افزایش معنی دار ($p<0/01$) بیان ژن *Bax* (۵/۲۱±۰/۷۳) نسبت به گروه سالم (۱±۰) شد. در حالیکه تیمار موش‌ها با نانوذرات اکسید آهن (۱۰ mg/kg) منجر به کاهش معنی دار بیان ژن *Bax* (۲/۴۶±۰/۲۲) در مقایسه با موش‌های دچار IR (۵/۲۱±۰/۷۳) شد. همچنین در گروه IR بعد از مواجهه با میدان مغناطیسی (MF) (۱ تسلا، به مدت ۴ روز و هر روز ۲۰ دقیقه) کاهش معنی دار ($p<0/05$) بیان ژن *Bax* (۳/۲۸±۰/۳۳) نسبت به گروه دچار IR (۵/۲۱±۰/۷۳) مشاهده شد. استفاده همزمان از میدان مغناطیسی با شدت ۱ تسلا و نانوذرات اکسید آهن با غلظت ۱۰ mg/kg (۴/۱۷±۰/۵۹) تفاوت آماری قابل توجهی با گروه IR (۵/۲۱±۰/۷۳) نشان نداد. در حالیکه کاهش معنی دار ($p<0/05$) بیان ژن *Bax* در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن به تنهایی (۲/۴۶±۰/۲۲) و یا در مواجهه با میدان مغناطیسی به تنهایی (۳/۲۸±۰/۳۳)، در مقایسه با گروه تحت تیمار همزمان آن دو (۴/۱۷±۰/۵۹) بیشتر مشهود بود. همچنین نرخ کاهش بیان ژن *Bax* در گروه تحت تیمار با نانوذرات

در افزایش نفوذ پذیری اندوتلیال عروقی دارند. بر اساس نتایج این مطالعه، این نانوذرات از طریق تولید فرم‌های اکسیژن فعال (reactive oxygen) و تثبیت میکروتوبول‌ها منجر به افزایش نفوذپذیری عروق می‌گردند. این نتایج پیشنهاد می‌کند که از نانوذرات اکسید آهن بتوان جهت افزایش کارایی درمان‌های سیستم اعصاب مرکزی استفاده نمود (۸).

در مطالعه حاضر نانوذرات اکسید آهن به تنهایی قادر به کاهش مرگ سلول‌های عصبی بودند بطوریکه نتایج آزمون TUNEL و بیان ژن *Bax* کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها را بعد از القا ایسکمی تأیید نمود. مطالعه *Palizvzn* و همکاران نشان داد که نانو ذرات اکسید آهن توان بالایی در افزایش حفاظت عصبی و ترمیم ضایعات عصبی دارد (۱۳). همچنین استفاده از میدان مغناطیسی در این مطالعه اثر کاهش مرگ سلول‌های عصبی بعد از ایسکمی را نشان داد؛ هرچند تأثیر آن کمتر از نانوذرات به تنهایی بود. به نظر می‌رسد میدان مغناطیسی با تغییر در نفوذپذیری غشاء از طریق برهم‌کنش با یون‌ها و مولکول‌های آلی مثل پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها منجر به رشد سلولی و مهار آپوپتوز گردد (۹ و ۱۰). نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی توان افزایش فعالیت میتوکندریایی در موش‌های مبتلا به پارکینسون را داشتند (۱۴). بنابراین می‌توانند به این روش مانع اثر رادیکال‌های آزاد بر میتوکندری و موجب کاهش القاء مرگ سلولی حاصل از ایسکمی شوند.

نتایج این مطالعه و دیگر مطالعات نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید آهن به تنهایی و میدان مغناطیسی به تنهایی باعث کاهش القاء مرگ بعد از ایسکمی در هیپوکمپ مغز موش می‌شوند. هرچند کاهش القاء آپوپتوز در سلول‌های آسیب‌دیده مغزی تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن بسیار بیشتر از مجاورت مغز با میدان

مغناطیسی بود. به نظر می‌رسد این امر نتیجه افزایش تکثیر سلول‌ها در موضع آسیب، کاهش اثرات زیانبار رادیکال‌های آزاد و افزایش بقای اجزای مهم سلولی در اثر رسانش بیشتر مواد حیاتی به درون سلول به واسطه نانوذرات اکسید آهن در مقایسه با میدان مغناطیسی باشد. از سوی دیگر استفاده همزمان این دو تیمار اثر عکس داشته و تغییر چندانی نسبت به سلول‌های آسیب دیده مغزی بدون تیمار نشان نداد. لازم است برای افزایش اثر همزمان این دو تیمار همانند مطالعه Pita-Thomas و همکاران از ولتاژهای متفاوت و یا تغییر در زمان مجاورت با میدان مغناطیسی استفاده نمود (۱۵) تا اثربخشی نانوذرات را افزایش دهد. از سوی دیگر در تیمار همزمان با نانوذرات و میدان مغناطیسی بیان ژن پیش‌آپوپتوزی *Bax* کمتر از مدل موشی دچار ایسکمی بود که این نتیجه مؤید این امر است که ادامه تیمارها با نانوذرات میدان مغناطیسی به مدت طولانی تر یا با ولتاژهای متفاوت ممکن است باعث کاهش مرگ سلولی و افزایش حفاظت‌کنندگی و ترمیم نوروها بعد از القاء ایسکمی گردد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که غلظت 10mg/kg از نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی به شدت ۱ تسلا (۲۰ دقیقه) به مدت ۴ روز به تنهایی قادرند باعث کاهش مرگ سلولی بعد از القاء ایسکمی ریپرفیوژن در موش صحرایی شوند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای دکتر احمد رضا دهپور ریاست آزمایشگاه بیمارستان امام خمینی و پرسنل آزمایشگاه که در انجام تحقیق همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

The Role of Iron Oxide Nanoparticles and Magnetic Field on Apoptosis and Bax Gene Expression in Rat Hippocampus after Ischemic Reperfusion

Sh. Bagheri Tari (MSc)¹, Z. Khazaei Koohpar (PhD)^{*1}, M. Falahati (PhD)²

1.Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, I.R.Iran.

2.Department of Nanotechnology, Faculty of Science and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 20(2); Feb 2018; PP: 42-8

Received: Jan 7th 2017, Revised: Oct 22th 2017, Accepted: Dec 12th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Stroke is the second leading cause of mortality in the worldwide. After a stroke, many neurons in the ischemic penumbra will undergo apoptosis. The aim of this study was investigation of effects of iron oxide nanoparticles and magnetic field on apoptosis reduction after ischemic reperfusion in rat model.

METHODS: In this experimental study, 50 male Wistar rats weighing 220-250g were randomly divided into five groups of 10 rats each: including control, sham (ischemic reperfusion model), ischemic reperfusion + iron oxide nanoparticles (10mg/kg), ischemic reperfusion +magnetic field (1 Tesla, 20 min in 4 days), and ischemic reperfusion + iron oxide nanoparticles and magnetic field groups. Injections were performed intraperitoneally. After Four days, the hippocampi were removed for studying of Apoptosis Induction (by TUNEL technique) and changes in *Bax* gene expression (by Q-PCR method).

FINDINGS: After induction of ischemic reperfusion, TUNEL⁺ cells number treated with iron oxide nanoparticles (7±2) and or the magnetic field (12±2) had significant decrease (p<0.01) relative to ischemic reperfusion group (27±5) during 4 days. But simultaneous treatment with nanoparticles and magnetic field (23±2.6) did not show significant difference compared to ischemic reperfusion group (27±5) during 4 days. Furthermore *Bax* gene expression decreased in iron oxide nanoparticles treated group (2.46±0.22) or the magnetic field exposed group (3.28±0.33) significantly (p<0.01) compared to ischemic reperfusion model (5.21±0.73)..

CONCLUSION: It seems that iron oxide nanoparticles as well as magnetic field to be two effective methods in decrease of apoptosis after ischemic reperfusion.

KEY WORDS: *Bax, Iron Oxide, Ischemia, Magnetic Field, Nanoparticles, Reperfusion*

Please cite this article as follows:

Bagheri Tari Sh, Khazaei Koohpar Z, Falahati M. The Role of Iron Oxide Nanoparticles and Magnetic Field on Apoptosis and Bax Gene Expression in Rat Hippocampus after Ischemic Reperfusion. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(2):42-8.

•Corresponding Author; Z. Khazaei Koohpar (PhD)

Address: Department of Cellular and Molecular Biology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon, I.R.Iran

Tel: +98 11 54271105

E-mail: khazaei@toniau.ac.ir

References

1. Marlier Q, Verteneuil S, Vandenbosch R, Malgrange B. Mechanisms and functional significance of stroke-induced neurogenesis. *Front Neurosci*. 2015;9:458.
2. Rabiei Z, Bigdeli M, Lorigooini Z. A review of medicinal herbs with antioxidant properties in the treatment of cerebral ischemia and reperfusion. *J Babol Univ Med Sci*. 2015;17(12):47-56. [In Persian]
3. Jamali s, Abbasnejad M, Esmaeili mahani S, Badoei-Dalfard A, Kooshki R. Learning and memory impairment induced by the injection of ascorbic acid and ascorbate oxidase into the hippocampus in the morris water maze. *J Babol Univ Med Sci*. 2015;17(4):36-43. [In Persian].
4. Ohira T, Shahar E, Chambless LE, Rosamond WD, Mosley TH, Folsom AR. Risk factors for ischemic stroke subtypes: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Stroke*. 2006;37(10):2493-8.
5. Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F. MiR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci*. 2009;12(4):399-408.
6. Petters C, Irrsack E, Koch M, Dringen R. Uptake and metabolism of iron oxide nanoparticles in brain cells. *Neurochem Res*. 2014;39(9):1648-60.
7. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*. 2008;108(6):2064-110.
8. Apopa PL, Qian Y, Shao R, Guo NL, Schwegler-Berry D, Pacurari M, et al. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Particle and fibre toxicology. Part Fibre Toxicol*. 2009;6:1
9. Hunt RW, Zavalin A, Bhatnagar A, Chinnasamy S, Das KC. Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications. *Int J Mol Sci*. 2009;10(10):4515-58.
10. Veisheh O, Gunn JW, Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(3):284-304.
11. Kim JA, Lee N, Kim BH, Rhee WJ, Yoon S, Hyeon T, et al. Enhancement of neurite outgrowth in PC12 cells by iron oxide nanoparticles. *Biomater*. 2011;32(11):2871-7.
12. Estevez AY, Pritchard S, Harper K, Aston JW, Lynch A, Lucky JJ, et al. Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(6):1155-63.
13. Palizvzn M, Khademi S, Ghazavi A, Mosayebi G. Correlation of two way active avoidance learning with Nitric Oxide and Ferric reduction/antioxidant power in rats. *Arak Med Univ J*. 2006;9(4):1-8. [In Persian].
14. Umarao P, Bose S, Bhattacharyya S, Kumar A, Jain S. Neuroprotective potential of superparamagnetic iron oxide nanoparticles along with exposure to electromagnetic field in 6-ohda rat model of parkinson's disease. *J Nanosci Nanotechnol*. 2016;16(1):261-9.
15. Pita-Thomas W, Steketee MB, Moysidis SN, Thakor K, Hampton B, Goldberg JL. Promoting filopodial elongation in neurons by membrane-bound magnetic nanoparticles. *Nanomedicine*. 2015;11(3):559-67.